Aus dem Pathologischen Institut der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. E. Letterer

6-Mercaptopurin und die caseininduzierte Amyloidose

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
OTTO KÄFER
aus Stuttgart

1965

8252

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. E. Letterer

6-Mercaptopurin und die caseininduzierte Amyloidose

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
OTTO KÄFER
aus Stuttgart

1965

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Dekan: Prof. Dr. W. Schulte

1) Berichterstatter: Prof. Dr. E. Letterer

2) Berichterstatter: Prof. Dr. M. P. Geppert

Druck: Repro-Anstalt W. Betz Tübingen

Meinen Eltern

Herrn Professor Dr. E. Letterer möchte ich für die Überlassung des Themas und die liebenswürdige persönliche Unterstützung bei der Abfassung dieser Dissertation herzlich danken.

Mein Dank gebührt auch Frau Professor Geppert, die freundlicherweise die statistischen Berechnungen durchsah.

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	Seite	1
Versuchsmaterial	Seite	2
I. Die Wirkungen von 6-Mercaptopurin	Seite	3
II. Die experimentelle Erzeugung von Amyloid mit Casein	Seite	7
III. Der Einfluß von 6-Mercaptopurin auf die caseininduzierte Amyloidose	Seite	10
Besprechung der Versuchsergebnisse	Seite	15
Zusammenfassung	Seite	23
Literaturverzeichnis	Seite	24
Lebenslauf	Seite	30

Schon 1926 zog Letterer bei der Entstehung der Amyloidose ein immunbiologisches Geschehen in Erwägung. Diese Ansicht blieb zwar in den folgenden Jahren nicht unwidersprochen, jedoch kann man heute auf Grund umfangreicher Untersuchungen (15;77;95;100) annehmen, daß bei der experimentell erzeugten Amyloidose Immunisierungsprozesse eine Rolle spielen.

In den letzten Jahren wurde vielfach versucht, die Antigen-Antikörper-Reaktion mit dem Cytostaticum 6-Mercaptopurin zu beeinflussen. Die Mehrzahl der Autoren beobachtete dabei ein Sinken, bzw. das Ausbleiben der Antikörperproduktion (6;48;51;68;78-83), andere wiederum beobachteten keine, bzw. keine sicheren Veränderungen (37;40). Der Grund für die negativen Ergebnisse wird darin gesehen, daß nicht alle Tierspezies auf 6-Mercaptopurin gleich ansprechen, bzw. nicht lange genug oder mit zu niederen Dosen behandelt wurde.

Es ist schon seit Jahrzehnten bekannt, daß Röntgenstrahlen die Antigen-Antikörper-Reaktion unterdrücken (5;25;27-29;44-45;50;74;85;92-94;99). Untersucher, welche die experimentelle Amyloidbildung mit Röntgenstrahlen beeinflußten, erhielten mehr und schneller Amyloid (17;98). Abhängig vom Zeitpunkt der Anwendung und von der Menge von Cortison kann man die Antigen-Antikörper-Reaktion verstärken oder unterdrücken (7-10). Analog waren die Ergebnisse der Untersucher, welche die experimentelle Amyloidbildung zusätzlich mit Cortison beeinflußten. Sie erhielten mehr (52;53;95;97) bzw. weniger (76) Amyloid (20;23;41).

Unter der Voraussetzung, daß die Amyloidose im Experimentalfall ein Antigen-Antikörper-Reaktionsphänomen ist und unter der Voraussetzung, daß 6-Mercaptopurin die Antikörperbildung herabsetzt, wurden folgende Experimente angesetzt.

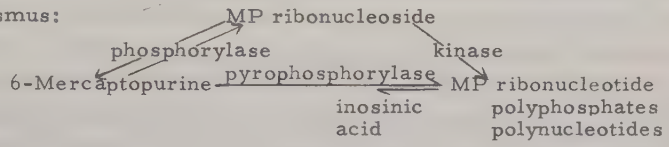
Versuchsmaterial

Verwendet wurden etwa drei Monate alte, zwischen 21 und 30 g schwere Albinomäuse aus hauseigener Inzucht. In den einzelnen Gruppen wurden Tiere mit annähernd gleichem Gewicht bevorzugt.
Acht Tage vor und während des Versuchs wurden die Mäuse mit Hafer und Wasser ad libitum gefüttert.
Die Tötung der Tiere erfolgte durch Dekapitation und Entblutung. Histologisch wurden regelmäßig Milz, Leber, Nieren, Herz, Lungen, Lymphknoten und Knochenmark untersucht. Die Färbung des mit Paraffin eingebetteten Materials wurde vorwiegend mit Hämatoxylin-Eosin.
Casein-NaOH-Lösung, subcutan in die Rückenhaut gespritzt, und Casein-$NaHCO_3$-Lösung, intraperitoneal gespritzt, wurde nach der von Letterer 1926 angegebenen Methode angesetzt.
Die 6-Mercaptopurinlösung wurde zweimal in der Woche frisch hergestellt. Man löste 270mg in einem Kubikzentimeter 0,5-prozentiger Natronlauge und verdünnte mit Aqua dest. Die Lösung wurde im Eisschrank aufbewahrt.
Die Mäuse wurden alle 5 Tage gewogen, und die danach errechnete Menge 6-Mercaptopurin mit einer 1ccm-Tuberkulinspritze intraperitoneal gespritzt.
Die Milzexcision in einer Gruppe erfolgte unter sterilen Bedingungen in Evipannarkose (0,01ml/g Körpergewicht einer zweiprozentigen Evipannatriumlösung intraperitoneal).

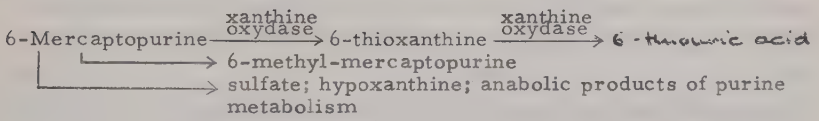
I. Die Wirkungen von 6-Mercaptopurin

Elion und Hitchings führten 1951 6-Mercaptopurin als möglichen Antagonisten der Nucleinsäuresynthese ein. Ein Jahr später gelang ihnen die Synthese. Daraufhin wurde vor allem die Wirkung auf Mikroorganismen, Tumoren und Leukämien untersucht.
Den Stoffwechsel von 6-Mercaptopurin stellt man sich heute schematisch etwa folgendermaßen vor (Brockman).

Anabolismus:



Katabolismus:



Die Grundlagen dieses Modells bilden die Arbeiten von Brockman, Loo, Carey, Miner und Silberman. Andere Autoren haben teils in vitro, teils in vivo, einige heute genau bekannte enzymatische Reaktionen bestimmen können, welche 6-Mercaptopurin unterdrückt.

1. 5-phosphoribosyl-1-PP+ glutamin + H_2O ⟶ 5-phosphoribosylamin + Glutamat + PP (38;102)
2. Inosin-5'-Monophosphat + L-asparate + GTP ⟶ adenyl-succinate + GTP + P (73)
3. Adenylosuccinate ⇌ AMP + Fumarate (43)
4. IMP ± DPN + H_2O ⟶ xanthylic acid + DPNH + H (43)
5. Nicotinamid mononucleotid + ATP ⟶ DPN + PP (1;2)

Berichtet wird auch über eine unspezifische Hemmung von CoA, ebenso wie in vitro eine Verdrängung von 6-Mercaptopurin durch CoA beobachtet wurde (4;11). Wilmanns schreibt von einer Abnahme der Aktivität von C_1-Bindungen, was zu einer Hemmung der Nucleinsäuresynthese führe.
Wie in der Einleitung schon angedeutet, wirkt 6-Mercaptopurin auch auf

die Antikörperproduktion. Der genaue Wirkungsmechanismus ist bis heute unbekannt.
Sterzl beschreibt die Unterdrückung der inductiven Phase und damit die vollständige Aufhebung der AK-Produktion. Berenbaum, LaPlante und Goh sprechen nur von einer Senkung des AK-Titers, wobei letzterer jedoch auch von negativen Versuchsergebnissen berichtet.
Mit hohen Dosen vermochten LaPLante, Hoyer und Schwartz auch die "secondary immune response" zu unterdrücken. Schwartz glaubt, daß 6-MP (6-Mercaptopurin) das antikörperbildende Gewebe direkt chemisch beeinflußt und zwar über den Nucleinsäurestoffwechsel. Eine unspezifische Einwirkung auf die Proteinproduktion hält er auf Grund seiner Serumuntersuchungen für unwahrscheinlich. Mannick, der genau dieselbe Versuchsanordnung nimmt, kann jedoch die Ergebnisse von Schwartz nicht bestätigen. Genghof und Mitarbeiter schließen aus ihren Versuchen, daß 6-MP keinen Einfluß auf die AK-Produktion hat. Die Verfasser glauben jedoch, daß sie zu niedere Dosen angewandt hätten (40mg/kg/Tag bei Meerschweinchen), bzw. daß 6-MP nicht bei allen Tierspezies gleich wirke.
Page beschäftigte sich mit der Entzündung verbunden mit 6-MP-Behandlung. Er findet, daß nach einer gewissen Behandlungszeit die Monocyten zerstört würden und die Entzündung damit gebremst würde. Nach Absetzen der 6-MP-Behandlung hört die Wirkung sofort auf. Außerdem beobachtete er einen sehr starken Gewichtsverlust bei fast allen seinen Versuchstieren.

In unserem Versuch achteten wir auf makroskopisch und histologisch wahrnehmbare Veränderungen. Die Dosierung von 3mg bzw. 6mg 6-MP/kg Körpergewicht/Tag entspricht etwa der Größenordnung, die auch von Schwartz angewandt wurde. Die Mäuse, die wie oben angegeben nur Hafer und Wasser bekamen, wurden täglich intraperitoneal gespritzt. Alle 5 Tage wurden sie gewogen, und ebenfalls alle 5 Tage wurde eine Gruppe aus jeder Reihe getötet und untersucht.

Reihe 1: 3mg 6-MP/kg Körpergewicht/Tag ip

Gruppe	Anzahl d. Tiere	Versuchsd. in Tagen	Gewichtsver-änderung in %	Milzfaktor	Zell-zahl
1a	5	5			2,6
1b	4	10			2,6
1c	5	15			2,8
1d	5	20			2,4
1e	4	30	-1,0±12,2±6,1	+3,9±2,8±1,4	2,2

Reihe 2: 6mg 6-MP/kg Körpergewicht/Tag ip

Gruppe	Anzahl d. Tiere	Versuchsd. in Tagen	Gewichtsver-änderung in %	Milzfaktor	Zell-zahl
2a	5	5			3,o
2b	5	10			2,6
2c	5	15			3,0
2d	5	20			1,8
2e	5	30	+6,6±20,5±9,1	+2,0±0,6±0,3	0,7

Bei Angaben eines Mittelwertes gaben wir noch den einfachen mittleren Fehler und den mittleren Fehler des Mittelwertes an. Bei der Versuchsdauer aus technischen Gründen nur den einfachen mittleren Fehler.

Der Begriff Milzfaktor wurde von Letterer 1934 angegeben: Milzgewicht in mg dividiert durch Körpergewicht in g .

Die Rubrik Zellzahl soll aussagen, wie viele Zellen im histologischen Knochenpräparat der Wirbelsäule zu sehen sind. Die Bestimmung erfolgte durch Schätzung, indem man in 4 Gruppen unterteilte: ganz voll gleich +++ ; gar keine = 0; dazwischen + und ++. In der Tabelle wurden die Kreuze durch Zahlenwerte ersetzt.

Um zu zeigen, wie die Dezimalbrüche zustandekommen, sei folgendes Beispiel angeführt:

Maus 1 +++ = 3,0
Maus 2 ++ = 2,0
Maus 3 +++ = 3,0
Maus 4 +++ = 3,0
Maus 5 +++ = 3,0

Gruppe =14,0 : 5 = 2,8

Wir sind uns bewußt, daß diese Methode nur einen sehr approximativen Schätzungswert gibt und nur einen groben Überblick verschafft. -- In unbehandelten Gruppen war der Durchschnitt 2,8.

An den Organen Herz, Lunge, Leber, Niere, Milz und Lymphknoten ist bei allen Tieren nichts Besonderes aufgefallen. Auch die Anzahl der Zellen zeigte im wesentlichen keinen Unterschied zu unbehandelten Tieren desselben Inzuchtstammes, bis auf die Gruppe 2e, die 30 Tage lang mit 6mg 6-MP/kg/Tag behandelt wurde. Im Knochenmark von zwei Mäusen, denen man schon im Leben die Anämie ansah, fand man nur noch vereinzelte Erythrocyten und keine kernhaltigen Zellen mehr.
Die leichte Gewichtszunahme der 6mg-Tiere dürfte auf Odeme zurückzuführen sein.

Als Kontrolle nahmen wir eine Gruppe, die das Lösungsmittel von 6-MP im gleichen Volumenmaßstab wie sie 6-MP bekommen hätten, 30 Tage lang intraperitoneal gespritzt bekam. Von den 15 Tieren bekam keines Amyloid; die Zellzahl im Knochenmark betrug 2,9. Das Körpergewicht blieb bis zum letzten Behandlungstag konstant.

Anzahl d. Tiere	Versuchsd. in Tagen	Gewichtsveränderung in %	Milzfaktor	Zellzahl
14	3o	+1,3±8,7±2,3	5,0±1,2±0,3	2,9
1	24	-9,0	5,0	3,0

II. Die experimentelle Erzeugung von Amyloid mit Casein

Auf die Geschichte der Amyloidose wollen wir nicht eingehen, ebenso nicht auf die große Menge von Versuchen, die gemacht worden sind, um diese Krankheit zu erforschen. In den letzten Jahren sind zwei ausgezeichnete Monographien über die Amyloidose von Schneider und Christensen erschienen, die über alle bedeutenden Befunde, die bis heute erhoben worden sind, im wesentlichen Auskunft geben.

Alle unsere Experimente machten wir in der ersten Hälfte des Jahres 1962 und wiederholten sie jeweils ein halbes Jahr später, um festzustellen, ob, wie schon behauptet wurde und aus manchen eigentümlichen Befunden auch wir zunächst geneigt waren anzunehmen, die Jahreszeit tatsächlich einen Einfluß auf die Amyloidentstehung hat, und um gleichzeitig Kontrollen zu haben. — Um es gleich vorwegzunehmen: wir fanden keinen wesentlichen Unterschied.

Um zu sehen, ob 6-MP die Amyloidbildung verhindert, waren wir bemüht, eine Methode zu finden, mit der man mit größter Wahrscheinlichkeit Amyloid bekommt. Dabei war unser Bestreben, so weit wie möglich ohne Infektion zu arbeiten. Wir verwandten deshalb die Methode von Letterer, indem wir fünfmal in der Woche 0,5ccm Casein-$NaHCO_3$ ip spritzten. Damit werden, im Falle einer Infektion infolge der Injektion die an der folgenden Peritonitis erkrankten Tiere automatisch ausgeschieden.
Nach einer Behandlungsdauer von 6 Wochen = 30 Tagen (am Wochenende spritzten wir nicht) machten wir eine Milzexcision, um zu sehen, ob schon Amyloid vorhanden ist. Von 30 Versuchstieren war zu diesem Zeitpunkt nur ein einziges an Amyloid erkrankt; da dieses Tier aber Bißinfektionen hatte, so mußte das Amyloid der Milz - bei negativem Befund aller anderen Tiere - wohl hierauf zurückgeführt werden.
Nach der Operation setzten wir die Behandlung fort. Nach 30 Tagen, an denen wir nun aber ununterbrochen spritzten, erhielten wir in einem hohen Prozentsatz Amyloid.

Reihe 4: 0,5ccm Casein-$NaHCO_3$ ip fünfmal in der Woche : sechs Wochen lang

Operation

0,5ccm Casein-$NaHCO_3$ ip täglich 30 Tage lang

Zeit	Anzahl d. Tiere	Versuchsd. in Tagen	Amyloidstärke der Milz	Leber-amyloid	Zell-zahl
Januar bis März	12	75	2,1	2von3	2,7
	3	44			2,7
Juni bis August	11	75	2,0		2,8
	2	75			2,5
	2	44			3,0

:en positiven Ausfall des zweiten Teiles des vorherigen Versuches führten wir auf die stärkere Belastung der Tiere zurück und behandelten deshalb unsere nächste Gruppe mit derselben Caseinmenge 30 Tage lang hintereinander ohne jede Unterbrechung. Von den 28 Mäusen dieser Gruppe fanden wir bei der Autopsie bei 25 Tieren eine Amyloidose. Offenbar wirkt sich also eine Injektionspause von zwei Tagen in der Woche deutlich auf den positiven bzw. negativen Erfolg der amyloidkrankmachenden Behandlung aus.

Reihe 5 : 0,5ccm Casein-$NaHCO_3$ ip

Zeit	Anzahl der Tiere	Versuchs-dauer in Tagen	Gewichtsver-veränd. in %	Milzfak-tor	Amyloid-stärke d. Milz	Leber-amyl.	Zell-zahl
April	12	30	+ 7,3±3,2±0,9	+8,6±2,2±0,5	1,6	4von12	2,6
	1	30	- 2,1	+6,8			2,5
Sep-tember	13	30	+13,8±4,9±1,4	+8,3±2,0±0,6	1,7	9von13	2,7
	2	30	+ 8,5±0,5±0,4	+6,8±0,6±0,4			2,5

Die Amyloidstärke der Milz haben wir nach der Methode von Letterer 1949 beurteilt : (+) Spuren von Amyloid vorhanden

\+ einfache amyloide Ringe um alle oder einzelne Follikel

\+ + die amyloiden Ringe um die Follikel berühren sich gegenseitig
\+ + + es ist zur diffusen Amyloidose der Milz gekommen

In der Tabelle haben wir, wie schon bei der "Zellzahl", die Pluskreuze in Zahlenwerten ausgedrückt: (+) = 0,5 + + + = 3,0. Diese Methode ist übrigens fast identisch mit jener von Christensen 1959, der nur mit den doppelten Werten arbeitet: 0,5 bei Letterer entspricht dem Wert 1,0 bei Christensen. Entsprechend die anderen Werte.

Da uns das oben genannte Versuchsergebnis noch nicht optimal erschien, verzichteten wir auf die ip-Injektion und behandelten die Mäuse mit 0,5ccm Casein-NaOH, das wir subcutan in die Rückenhaut zwischen die beiden Schulterblätter einspritzten (Letterer 1934). Nach 30 Tagen waren alle Tiere an einer Amyloidose erkrankt. Alle Mäuse hatten jedoch, wie erwartet, im Bereich der Injektionsstelle eine Gewebsnekrose und ein bis zu 4 mm dickes Granulationsgewebe.

Reihe 6: 0,5ccm Casein-NaOH/Tag sc

Zeit	Anzahl der Tiere	Versuchsdauer in Tagen	Gewichtsveränderung in %	Milzfaktor	Amyloidstärke d. Milz	Leberamyl.	Zellzahl
Mai	14	17	+17,1±7,6±2,0	8,7±1,8±0,5	1,9	10von14	2,8
	1	30	+ 5,0	7,7	0,5		3,0
Oktober	14	30	+14,1±10,1±2,7	9,0±2,3±0,6	1,9	11von14	2,9

III. Der Einfluß von 6-Mercaptopurin auf die caseininduzierte Amyloidose

Um den Einfluß von 6-Mercaptopurin auf die experimentelle Amyloiderzeugung zu erkennen, kombinierten wir die beiden genannten Versuchsanordnungen.

1. a) Casein-NaOH + 3mg 6-MP/kg Körpergewicht/Tag
   b) Casein-NaOH + 6mg 6-MP/kg Körpergewicht/Tag
   In beiden Versuchsgruppen erreichte nur ein Teil der Tiere die gewünschte Versuchsdauer von 30 Tagen. Während des Versuchs beobachteten wir, daß die Mäuse auf die Casein-NaOH-Injektionen kaum mit Nekrosen reagierten, im Gegensatz zu den Mäusen, die nur Casein-NaOH bekommen hatten.

Die linke Maus erhielt Casein-NaOH und 6mg 6-MP/kg/Tag
Die rechte Maus erhielt nur Casein-NaOH
Beide Mäuse am 16. Behandlungstag.

Hatte sich einmal eine Wunde gebildet, so heilte sie fast nie mehr ab.

Die Wunde auf dem Bid besteht seit 23 Tagen. Die Maus erhielt Casein-NaOH und 6mg 6-MP/kg/Tag.

Der Milzfaktor war etwas geringer im Vergleich zu dem der oben angeführten Tiere, die nur mit Casein behandelt wurden. Amyloid fanden wir bei den 13 bzw. 10 Tieren, die von jeweils 15 Tieren die Versuchsdauer von 30 Tagen erreicht hatten, bei 10 bzw. 6 Mäusen sehr ausgeprägt in der Milz. In der Tabelle finden wir die Werte 2,1 bzw. 2,6. Im Knochenmark der 6-mg Gruppe war die Zellzahl stark reduziert.

Reihe 7 : 3mg 6-MP/kg/Tag ip und 0,5ccm Casein-NaOH sc

Anzahl der Tiere	Versuchs-dauer in Tagen	Gewichtsver-änderungen in %	Milzfaktor	Amyloid-stärke der Milz	Leber-amyl.	Leber-nekr.	Zell-zahl
10	30,0	+ 7,3±8,5±2,7	8,8±3,5±1,1	2,1	10von10		2,9
3	30,0	- 9,3±12,1±3,3	5,0±2,9±1,7			2von3	1,2
2	20,5±1,5	-19,5±11,5±8,1	3,7±0,8±0,5			1von2	2,0

Reihe 8a: 6mg 6-MP/kg/Tag ip und 0,5ccm Casein-NaOH sc

Anzahl der Tiere	Versuchs-dauer in Tagen	Gewichtsver-änderungen in %	Milzfaktor	Amyloid-stärke der Milz	Leber-amyl.	Leber-nekr.	Zell-zahl
6	30,0	+ 0,7±17,1± 7,0	7,3±1,8±0,7	2,6	5von6	3von6	1,4
2	22,0±1,0	- 1,8± 8,0± 5,6	8,7±4,3±3,0	1,5	1von2	2von2	0,8
4	30,0	-21,5±26,9±13,4	5,1±2,9±1,5			3von4	0,8
3	25,0±2,6	-10,0± 5,6±3,2	3,4±1,9±1,1			1von3	1,0

2. Um zu sehen, ob bei noch höherer 6-MP-Dosierung die Amyloidbildung noch stärker herabgesetzt wird, gaben wir einer Gruppe 12mg 6-MP/kg/Tag. Als Vergleich lief eine Gruppe mit 6mg 6-Mercaptopurin.
Die 6mg-Gruppe zeigte keine Abweichungen von der Parallelgruppe, der Reihe 8a, die auch 6mg 6-MP erhielt.
Bei der 12mg-Gruppe war die Lebensdauer noch stärker herabgesetzt. Eine einzige Maus erreichte das 30-Tage-Ziel. Obwohl alle Mäuse Amyloid hatten, betrug der Milzfaktornur 4,7. Die

Amyloidstärke ist mit 1,9 , wenn man die kurze Lebensdauer berücksichtigt, beachtlich hoch. Hoch ist auch der Prozentsatz der Lebernekrosen.

Reihe 8b: 6mg 6-MP/kg/Tag ip und 0,5ccm Casein-NaOH sc

Anzahl der Tiere	Versuchsdauer in Tagen	Gewichtsveränderungen in %	Milzfaktor	Amyloidstärke der Milz	Leberamyl.	Lebernekr.	Zellzahl
4	30,0	-26,3±14,9±7,5	5,9±2,9±1,5	2,0	2von4	3von4	1,3
5	25,2±1,7	-21,4± 7,4±3,3	5,2±1,5±0,6	1,9	3von5	5von5	0,7
3	30,0	-23,2± 4,2±2,6	3,6±0,6±0,4				1,5
2	25,0±2,0	-22,5±10,5±7,4	4,1±2,7±1,9				1,5

Reihe 9: 12mg 6-MP/kg/Tag ip und 0,5ccm Casein-NaOH sc

Anzahl der Tiere	Versuchsdauer in Tagen	Gewichtsveränder. in %	Milzfaktor	Amyloidstärke der Milz	Leberamyl.	Lebernekr.	Zellzahl
1	30,0	-28,0	6,1	2,0			1,0
14	25,1±3,4	-19,6±8,6±2,3	4,7±2,2±0,6	1,9	2von14	12von14	1,1

3. Um zu sehen, ob die Wirkung von 6-MP stärker ist, wenn man es vor der ersten Caseininjektion gibt, bildeten wir zwei Gruppen, die wir vor der ersten Caseininjektion 10 Tage lang mit 3mg bzw. mit 6mg 6-MP/kg/Tag spritzten. Im Vergleich zu den Reihen 7 und 8, bei denen wir mit beidem zugleich begannen, war die Lebenszeit verkürzt, wenn man die Zeit von der ersten Caseininjektion an rechnet. Von den Tieren der 6-mg-Gruppe erreichte keines das Versuchsziel. Die Gewichtsabnahme war stark; die Milzen waren sehr klein, und die Zellzahl im Knochenmark war ausgesprochen gering. Die Amyloidhäufigkeit zeigte keinen abweichenden Befund von den entsprechenden Vergleichsgruppen; nur die Amyloidintensität war etwas geringer.

Reihe 10 : 10 Tage lang 3mg 6-MP/kg/Tag ip , dann
3mg 6-MP/kg/Tag ip und 0,5ccm Casein-NaOH sc

Anzahl der Tiere	Versuchs-dauer in Tagen	Gewichtsver-änderungen in %	Milzfaktor	Amyloid-stärke der Milz	Leber-amyl.	Leber-nekr.	Zell-zahl
7	30,0	-10,6±12,0±4,5	7,7±3,4±1,3	2,2	6von7	3von7	2,0
3	28,0±1,0±0,6	- 6,3±20,2±11,7	8,0±2,7±1,5	2,0	2von3	2von3	1,0
2	30,0	- 2,0±10,0±7,0	7,2±3,7±2,7				1,5
2	17,0±5,0±3,5	-31,5±10,5±7,0	5,1±1,1±0,7			2von2	0,5

Reihe 11 : 10 Tage lang 6mg 6-MP/kg/Tag ip , dann
6mg 6-MP/kg/Tag ip und 0,5ccm Casein-NaOH sc

Anzahl der Tiere	Versuchs-dauer in Tagen	Gewichtsver-änderungen in %	Milzfaktor	Amyloid-stärke der Milz	Leber-amyl.	Leber-nekr.	Zell-zahl
7	26,3±2,9±1,1	-16,7±2,6±1,0	4,9±1,5±0,6	1,8	3von7	4von7	1,0
8	17,3±5,5±1,9	-23,5±7,9±2,8	4,0±1,3±0,5			8von8	0,7

4. Nun wollten wir noch sehen, ob eine Veränderung der Caseinmenge zu auffällig anderen Resultaten führt. Wir machten den extremen Versuch, indem wir die Caseinmenge verdoppelten. Da man 1,0ccm Casein-NaOH nicht auf einmal spritzen konnte, spritzten wir morgens und abends je 0,5ccm. 6-MP nahmen wir in der Dosis von 6mg/kg/Tag. Außerdem machten wir noch einen Versuch, bei dem wir vor Beginn der ersten Caseininjektion 10 Tage lang 6-MP spritzten.
Die Lebensdauer der Tiere in diesem Versuch war außerordentlich kurz. Amyloid fanden wir bei allen Tieren. Trotz der kurzen Lebensdauer der Tiere ist die Amyloidstärke in der Milz sehr hoch.

Reihe 12 • 6mg 6-MP/kg/Tag ip und 1 0ccm Casein-NaOH sc

Reihe 13 : lo Tage lang 6mg 6-MP/kg/Tag ip , dann
6mg 6-MP/kg/Tag ip und 1,0ccm Casein-NaOH sc

Anzahl der Tiere	Versuchs-dauer in Tagen	Gewichtsver-änderungen in %	Milzfaktor	Amyloid-stärke der Milz	Leber-amyl.	Leber-nekr.	Zell-zahl
R. 12 15	21,9±4,1±1,1	-19,1± 8,3±2,1	5,8±2,5±0,6	2, 3	9von15	5von15	1,8
R. 13 15	19,0±1,0±0,3	-13,3±10,9± ',8	4,3±1,6 -0,4	2, 3	4von15	6von15	1,3

5. Als Kontrollgruppe nahmen wir Tiere, die wir mit 0,5ccm Casein-NaOH sc spritzten und dazu noch mit dem Lösungsmittel von 6-Mercaptopurin, und zwar in derselben Menge, in der wir 6-MP gespritzt hätten.
Das Gewicht der Mi z entsprach dem der T ere, die nur Casein-NaOH bekommen ha ten. Amyloid fanden wir bei allen Tieren in der Milz, in 60% der Fälle auch in der Leber. Jedoch fanden wir in der Leber keine Nekrosen. Die Zellzahl im Knochenmark war unverändert.

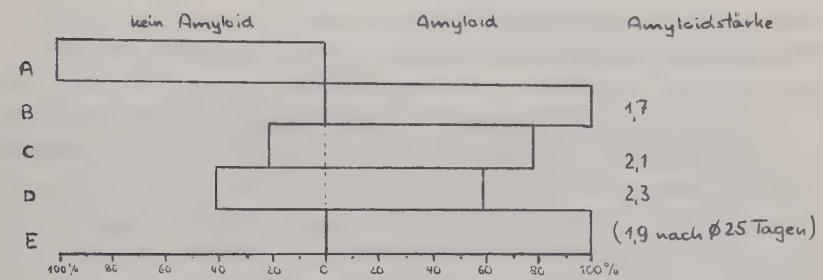
Reihe 14 : 6-MP-Lösungsmittel ip und 0,5ccm Casein-NaOH sc

Anzahl der Tiere	Versuchs-dauer in Tagen	Gewichtsver-änderungen in %	Milzfaktor	Amyloid-stärke der Milz	Leber-amyl.	Leber-nekr.	Zell-zahl
14	30,o	- 2,2±5,4±1,5	9,9±2,1±0,6	1, 3	9von14		2,9
1	25,0	-14,0	11,7	2, 0			1,5

Besprechung der Versuchsergebnisse

Wenn wir unsere Versuche überblicken, sehen wir, daß wir mit der Casein-NaOH-Behandlung allein nach 30 Tagen bei allen Mäusen Amyloid erzeugt hatten. Mit 6-MP allein haben wir, ebenso wie van Stipriaan, der auch noch höhere Dosierungen verwandte, nie Amyloid erhalten. Verbanden wir beide Behandlungsmethoden miteinander, so erhielten wir weniger häufig, aber stärker ausgeprägtes Amyloid, als mit Casein-NaOH allein.

Amyloidhäufigkeit nach 30 Behandlungstagen (außer E):



A	9 Tiere (Reihe 1 und 2)	nur 6-Mercaptopurin
B	42 Tiere (Reihe 6 und 14)	nur Casein
C	22 Tiere (Reihe 7 und 10)	3mg 6-MP/kg/Tag und Casein
D	17 Tiere (Reihe 8)	6mg 6-MP/kg/Tag und Casein
E	15 Tiere (Reihe 9)	12mg 6-MP/kg/Tag und Casein aber nur Ø 25 Tage lang

Um zu bestimmen, ob zwischen dem Auftreten von Amyloid bei Tieren, die nur Casein-NaHO bekommen haben, und solchen, die zusätzlich noch 6-MP bekamen, tatsächlich ein Unterschied besteht, machten wir den χ^2-Test. Wir verwandten dazu nur Tiere, welche die 30-Tage-Grenze erreicht hatten, um keinen Unsicherheitsfaktor hinzuzufügen. Den Vergleich zwischen den Gruppen, welche Casein und 3mg 6-MP bzw. Casein und 6mg 6-MP bekommen haben, stellten wir wegen der geringen Anzahl an Tieren nicht an.

Reihe	6a:	14 Tiere	14 positiv	0 negativ
	6b:	14 Tiere	14 positiv	0 negativ
	14:	14 Tiere	14 positiv	0 negativ
		42 Tiere	42 positiv	0 negativ

Reihe	7:	13 Tiere	10 positiv	3 negativ
	8a:	10 Tiere	6 positiv	4 negativ
	8b:	7 Tiere	4 positiv	3 negativ
	10:	9 Tiere	7 positiv	2 negativ
		39 Tiere	27 positiv	12 negativ

Bei der Gegenüberstellung der Tiere, die nur mit Casein, und der Tiere, die mit Casein und 6-MP behandelt wurden, ergibt sich folgende Aufteilung:

Behandlung \ Amyloid	positiv	negativ	zusammen
nur Casein	a = 42	b = 0	a+b = 42
Casein-6-MP	c = 27	d = 12	c+d = 39
zusammen	a+c = 69	b+d = 12	a+b+c+d = 81

$$N = a+b+c+d$$

$$= \frac{(|ad - bc| - 1/2\ N)^2\ N}{(a+b)\cdot(c+d)\cdot(a+c)\cdot(b+d)}$$

$$= \frac{(504 - 40,5)^2\ 81}{42\cdot39\cdot69\cdot12} = \frac{17\,400\,412,25}{1\,356\,264,00} = 12,8$$

DerWert von P ist kleiner als0,01. Der Unterschied ist also nicht zufällig, sondern statistisch hoch signifikant und zeigt, daß die 6-Mercaptopurinmedikation die Amyloidose herabsetzt.

Anders ist es mit der Amyloidstärke:
Bei 42 Mäusen der Reihen 6 und 14, die 30 Tage lang nur mit Casein behandelt wurden, fanden wir eine durchschnittliche Amyloidstärke von 1,9.
Bei 10 Tieren der Reihe , die 30 Tage lang mit Casein und 3mg 6-MP behandelt wurden, errechneten wir den Wert von 2,1.
Die Amyloidstärke 2,3 fanden wir bei 17 Tieren, die 30 Tage lang mit Casein und 6mg 6-MP behandelt wurden (Reihe 8).

Obwohl die 15 Tiere der Gruppe 9, die mit Casein und 12mg 6-MP gespritzt wurden, im Durchschnitt nur 25 Tage lang behandelt wurden, hatten sie eine Amyloidstärke von 1,9. Das bedeutet, daß die Amyloidstärke hier nach 25 Tagen schon etwas stärker war als bei Tieren, welche 30 Tage lang nur mit Casein behandelt wurden.
Noch auffallender ist der Befund bei den 30 Tieren der Reihen 12 und 13, die mit 6mg 6-MP behandelt wurden, bei denen man nach 22 bzw! 19 Behandlungstagen mit 1,0ccm Casein-NaOH einen Amyloidfaktor von 2,3 fand.
(Die Werte haben wir teilweise in das vorhergehende Schema eingetragen.)

In der Einleitung gingen wir von der Vermutung aus, daß die experimentelle Amyloidose ein Antigen-Antikörper-Reaktionsphänomen ist. Wir sahen in unseren Versuchen teils ein Ausbleiben, teils eine Verstärkung der Amyloidose. Bleiben wir bei der Hypothese, so können wir annehmen, daß im ersten Fall die Antikörperproduktion vollständig darniederliegt, im zweiten Fall die Immunitätsprozesse so geschädigt wurden, daß die Amyloidbildung früher oder intensiver eintrat, da die Tiere nach einem bestimmten Zeitraum stärker ausgebildetes Amyloid hatten. Auf diese Weise könnte man auch die Versuchsergebnisse von van Stipriaan erklären, der mit Nierenligaturen und 6-MP-Behandlung häufiger Amyloid bekam als ohne 6-MP-Zusatz.

Von vielen Forschern wurde immer wieder beobachtet, (Letterer, Latvalahti, usw.), daß die Milzen mit Amyloid schwerer, bzw. etwa doppelt so groß sind wie Milzen ohne Amyloid. Wir fanden beim Vergleich der 15 amyloidnegativen Tiere der Reihe 3, die weder mit Casein noch mit 6-MP behandelt wurden und die einen Milzfaktor von 5,0 ± 1,2±0,3 hatten, mit den 67 amyloidpositiven Tieren der Reihen 5, 6, 14, die 30 Tage lang nur mit Casein behandelt wurden und die einen Milzfaktor von 8,9 ±2,1±0,3 hatten, einen statistisch hoch signifikanten Unterschied. (P kleiner als 0,01).
Die Ausrechnung sei hier als Beispiel angeführt:

Reihe 3	$N_A = 14$	$\sum x_A = 69{,}4$	$\sum x_A^2 = 363{,}62$
Reihe 5,6,14	$N_B = 67$	$\sum x_B = 594{,}3$	$\sum x_B^2 = 5558{,}24$

Mittelwert $\bar{x}_A = 5,0 \pm 1,2 \pm 0,3$

$\bar{x}_B = 8,9 \pm 2,1 \pm 0,3$

$$s^2 = \left(\sum x_A^2 - \frac{(\sum x_A)^2}{N_A} + \sum x_B^2 - \frac{(\sum x_B)^2}{N_B}\right) : (N_A + N_B - 2)$$

$= (286,72 + 19,59) : 79 = 306,31 : 79 = 3,87$

$s = \sqrt{3,87} = 1,97$ = einfacher mittlerer Fehler

$$t = \frac{\bar{x}_A - \bar{x}_B}{s} \sqrt{\frac{N_A N_B}{N_A + N_B}} = \frac{3,9}{1,97} \sqrt{11,6} = 6,7$$

Freiheitsgrad $FG = N_A + N_B - 2 = 79$

Für $t = 6,7$ und $FG = 79$ gilt nach der t-Tabelle : P kleiner als 0,01.

Außerdem verglichen wir die Milzgewichte von amyloidnegativen Tieren nach verschiedenen Behandlungsmethoden von 30-tägiger Dauer.

A Behandlung ohne 6-MP und ohne Casein : Reihe 3
14 Tiere Milzfaktor 5,0±1,2±0,3

B Behandlung mit 6-MP und ohne Casein: Reihe 1 und 2
9 Tiere Milzfaktor 2,9±2,0±0,7

C Behandlung mit 6-MP und mit Casein : Reihe 7, 8 und 12
12 Tiere Milzfaktor 5,0±2,8±0,8

Beim Vergleich zwischen A und B fanden wir ein P, das kleiner als 0,01 ist.

Beim Vergleich zwischen B und C errechneten wir ein P, das zwischen 0,1 und und 0,05 liegt : der Unterschied wird nicht mehr als signifikant angesehen.

Das Gewicht von amyloidnegativen Milzen, die weder mit 6-MP noch mit Casein behandelt wurden, ist also beachtlich höher als das Milzgewicht solcher Mäuse, die mit 6-MP behandelt wurden.

Zwischen dem Milzgewicht der 67 amyloidpositiven Tiere der Reihen 5, 6 und 14, die nicht mit 6-MP behandelt wurden, deren Milzfaktor bei 8,9±2,1±0,3 lag, und dem Milzgewicht der 88 amyloidpositiven Tiere der Reihen 7, 8, 9, 10, 11, 12 und 13 die mit 6-MP behandelt wurden, deren Milzfaktor 6,1±2,7±0,3 betrug, ist ein signifikanter Unterschied.

P liegt zwischen 0,01 und 0,05.

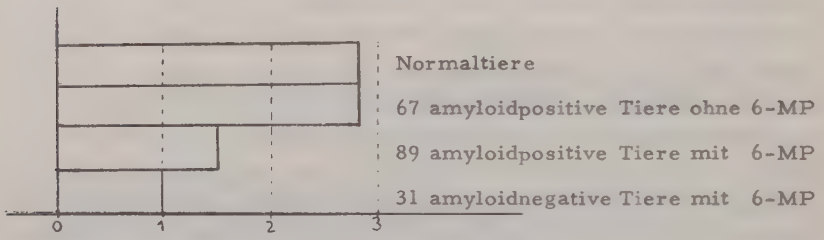
Zuletzt haben wir noch die Milzgewichte von Tieren verglichen, welche 30 Tage lang mit Casein und 6-MP behandelt worden sind, und die amyloidpositiv waren (27 Tiere der Reihen 7, 8 und 10 mit dem Milzfaktor 7,7±3,0±0,6), mit Tieren, welche amyloidnegativ waren (12 Tiere der Reihen 7, 8 und 10 mit dem Milzfaktor 5,0±2,8±0,8). Wir errechneten ein P , das kleiner als 0,01 ist.

Tiere, die nur mit 6-MP oder nur mit Casein behandelt wurden, starben nicht vor dem 30. Behandlungstag. Tiere, welche zugleich mit beidem behandelt wurden starben umso rascher, je größer die Belastung war, dh. je mehr Casein oder 6-MP man spritzte. Genau kann man die Lebensdauer nicht angeben, da wir nicht die Vitalität am 30. Behandlungstag in Zahlen ausdrücken können. Zwei Tiere zB. der Gruppe 2e waren am Ende des Versuches so schwach, daß sie kein Glied mehr rühren konnten; sie lagen wie Quallen am Boden und fühlten sich ebenso an; nur wenn man sie in den Schwanz kniff reagierten sie noch. Schnauze und Beine waren so weiß wie das Fell. — Ein anderes Tier dieser selben Gruppe war klinisch ebenso lebenskräftig wie unbehandelte Tiere.
Diese unregelmäßige Wirkung von 6-MP wurde auch auf anderen Gebieten beobachtet. So berichten Hubay, Robinson und Zukoski mit ihren Mitarbeitern, die alle die Transplantatantwort mit 6-MP zu verhindern suchten, über Einzeltiere mit enorm langen Überlebenszeiten der Transplantate, während beim Großteil der Versuchstiere keine Wirkung bemerkbar war.

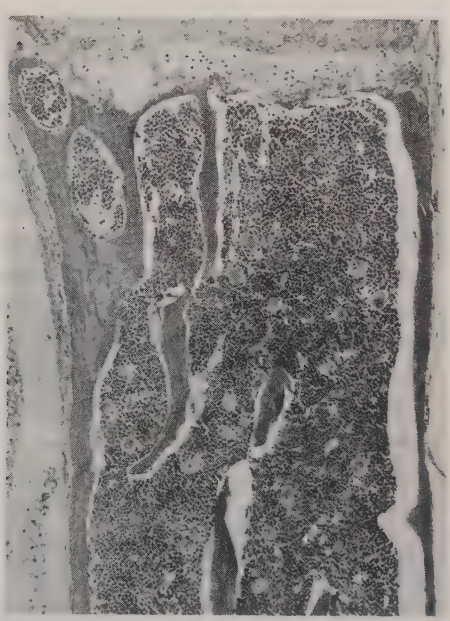
Die Herabsetzung der Lebensdauer dürfte unter anderem auch auf der Schädigung des blutbildenden Systems durch 6-MP begründet sein. Wie schon gesagt, ist die Angabe unserer "Zellzahl" nur ein grob geschätzter Wert. Wir fanden mit dieser Methode bei Normaltieren etwa den Wert 2,8. Denselben Wert fanden wir bei 67 amyloidpositiven Mäusen nach 30-tägiger Caseinbehandlung ohne 6-MP (Reihe 5, 6 und 14).
Bei 89 amyloidpositiven Mäusen, welche mit Casein und verschiedenen Dosen 6-MP behandelt wurden (Reihe 7, 8, 9, 10, 11, 12 und 13) fanden wir den Durchschnittswert 1,5.

Bei den 31 amyloidnegativen Tieren derselben Gruppen lag der Durchschnittswert sogar bei 1,0. Dabei muß noch berücksichtigt werden, daß die Zellzahl von den 10 amyloidpositiven Tieren der Reihe 7 (3mg 6-MP/kg/Tag) bei 2,9 lag, also einem Wert, der dem von Normaltieren entspricht.

Zellzahl:



Zellzahl 1,0
30 Tage lang mit 6mg 6-MP/kg/Tag behandelt; amyloidnegativ.



Zellzahl 3,0 - Normaltier

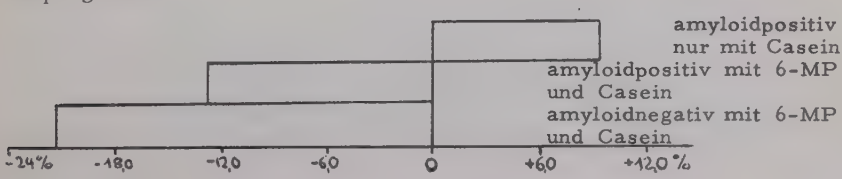
Beim Körpergewicht verhält es sich ähnlich. 72 Tiere, die nur mit Casein behandelt wurden (Reihe 5, 6 und 14), hatten durchschnittlich 9,4±9,7±1,1 % zugenommen. 118 Tiere der Reihen 7, 8, 9, 10, 11, 12 und13, die noch zusätzlich 6-MP gespritzt bekamen, hatten im Durchschnitt 14,6±13,8±1,3 % abgenommen. Die letzte Gruppe kann man wiederum in amyloidpositive und amyloidnegative Tiere aufteilen:

a) 91 amyloidpositive Tiere -12,8±14,2±1,5 %

b) 27 amyloidnegative Tiere -20,5±10,9±2,1 %

Die Unterschiede zwischen allen drei Gruppen sind statistisch signifikant. (P kleiner als 0,01).

Körpergewicht:



Zum Schluß sei noch ein Wort über Leberamyloid und Lebernekrosen hinzugefügt.

Fast 2 von 3 Tieren, bei denen man in der Milz Amyloid fand, hatten auch in der Leber Amyloid. Diesen Befund erhebt man bei Tieren, die 6-MP erhalten haben, und bei solchen, die kein 6-MP erhalten haben. Man fand nie Leberamyloid ohne Milzamyloid.

Lebernekrosen fand man auffallenderweise nur bei Tieren, welche Casein und 6-MP erhalten haben, gleichgültig, ob die Mäuse Amyloid hatten oder nicht. — Einen ähnlichen Befund erhob auch Turunen, der Lebernekrosen nur bei Tieren fand, welche er gleichzeitig mit Casein und Röntgenstrahlen behandelt hatte.

Zusammenfassung

1. Mit der in den Versuchen angewandten Casein-NaOH-Behandlung erhielt man nach einer 30-tägigen Behandlungsdauer bei allen Versuchstieren Amyloid. Mit 6-Mercaptopurin allein, gleichgültig was für eine Dosierung man verwendete, erhielt man nie Amyloid. Verband man beide Behandlungsmethoden miteinander, so erhielt man weniger häufig, was wir statistisch sichern konnten, jedoch sehr viel stärker ausgeprägtes Amyloid, als mit Casein allein.
2. Die schon lange bekannte Beobachtung, daß amyloidpositive Milzen schwerer sind als amyloidnegative Milzen, konnten wir bestätigen, und zwar sowohl bei Tieren, welche nur mit Casein und solchen, welche mit Casein und 6-Mercaptopurin behandelt wurden. Zwischen dem Milzgewicht dieser beiden Gruppen besteht ebenfalls ein statistisch signifikanter Unterschied.
3. Die Lebensdauer unserer Tiere sank mit der Erhöhung der Casein- und 6-Mercaptopurindosierung.
4. Das Körpergewicht nahm bei amyloidpositiven Mäusen, welche nur mit Casein behandelt wurden, zu, im Gegensatz zu solchen, die zusätzlich noch mit 6-Mercaptopurin behandelt wurden.
   Noch stärker nahmen amyloidnegative Tiere ab, welche mit Casein und 6-Mercaptopurin behandelt wurden.
5. Bei amyloidpositiven Tieren, welche nur mit Casein behandelt wurden, konnten wir keine Veränderungen am Knochenmark erkennen. Amyloidpositive Tiere die Casein und 6-Mercaptopurin injiziert bekamen, zeigten eine starke Reduktion der Zellzahl im Knochenmark, welche aber noch stärker bei amyloidnegativen Tieren mit derselben Behandlung war.

Literaturverzeichnis

1. Aktinson M.R. Jackson J.F. Morton R.K. Substrate specivity and inhibition of nicotinamid mononucleotide-adenyltransferase of liver nuclei : possible mechanism of effect of 6-mercaptopurine on tumor growth.
Nature 192.946 1961
2. Aktinson M.R. Jackson J.F. Morton R.K. Nicotinamide 6-mercaptopurine dinucleotide and related compounds potential sources of 6-mercaptopurine nucleotide in chemotherapy.
Nature 196.35 1962
3. Anderson E.P. Law L.W. Biochemistry of cancer.
Ann. Rev. Biochem 29.577 1960
4. Ambanelli U. Salvi G. The action of 6-mercaptopurine and of triethylenamine on the acetylating activity of normal and leucemic blood.
Acta Haemat. Basel 24.267
5. Benjamin E. Sluka E. Antikörperbildung nach experimenteller Schädigung des hämatopoetischen Systems durch Röntgenstrahlen.
Wien. klin. Woch. 21.311 1908
6. Berenbaum M.C. Effect of cytotoxic agents on antibody production.
Nature 185.167 1960
7. Berglund K. Studies on the factors which condition the effect of cortisone on antibody production.
1. The significance of time of hormone administration in primary hemolysin response.
Acta. Path. et Microbiol. Scandinav. 38.311 1956
8. ——— 2. The significance of the dose of antigen in primary hemolysin response.
Acta. Path. et Microbiol. Scandinav. 38.329 1956
9. ——— 3. The significance of time of hormone administration in primary agglutinin response to S. typhy (typhy H).
Acta. Path. et Microbiol. Scandinav. 38.403 1956
10. Berglund K. Fagraeus A. A biological factor inhibiting the effect of cortisone on antibody formation.
Nature 177.233 1956
11. Biesele J.J. Antagonistic effects of 6-mercaptopurine and coenzyme A on mitochondria and mitosis in tissue culture.
J. biophys. biochem. Cytol. 1.119 1955
12. Brockman R.W. Biochemical aspects of mercaptopurine inhibition and resistance.
Cancer Res. 23.1191 1963
13. Brockman R.W. Kelley G.G. Stutts P. Copeland V. Biochemical aspects of resistance to 6-mercaptopurine in human epidermoid carcinoma cells in culture.
Nature 191.469 1961
14. Burk D. Hochstein P. Hunter J. Landau B. Laszlo J. Wight K. Woods M. A rationale of cancer therapy based on primary inhibition of glucose phosphorylation (hexokinase reaction) at substrate, coenzyme, and enzyme levels.
Acta. Un. int. Cancr. 14.66 1958
15. Caesar r. Elektronenmikroskopische Untersuchungen an mensch-

lichem Amyloid dei verschiedenen Grundkrankheiten.
Path. et Mikrobiol. Basel 24. 387 1961

16. Cannon P.R. Chase W.E. Wissler R.W. The relationship of the protein-reserves to antibody production.
I. The effects of a low protein diet and of plasmapheresis upon the formation the agglutinins.
J. Immunol. 47. 133 1943

17. Christensen H.E. Hjort G.H. X-irradiation as accelerating factor in caseinate-induced amyloidosis in mice.
Acta. Path. et Microbiol. Scandinav. 47. 140 1959

18. Christensen H.E. Metalophil reticular cells in experimental mouse-amyloidosis.
Acta. Path. et Microbiol. Scandinav. 50. 29 1960

19. Christensen H.E. Hjort G.H. Histochemical and electron-microscopic investigations of experimental amyloidosis.
Acta. rheum. Scandinav. 7. 62 1961

20. Christensen H.E. Amyloidosestudier. En oversigt på grundlag af eksperimentelle undersøgelser.
Thesis (Copenhagen) 1963

21. Clarce D.H. Phillips F.S. Sternberg S.S. Hitchings G.H. Stock C.C. Elion G.B. 6-mercaptopurine: Effects mouse sarcoma 180 and in normal animals.
Cancer Res. 13. 593 1953

22. Cobb G.M. Basu P.K. Effect of 6-mercaptopurine on the immune response in interlammelar corneal heterografts.
Transplantation 1. 232 1963

23. Cohen A.S. Calcins E. Mullinax P.F. Studies in experimental amyloidosis.
III. The effect of cortisone administration on the incidece of casein-induced amyloidosis in the rabbit.
Arch. Intern. Med. 110. 569 1962

24. Condie R.M. Good R.A. Page A.R. Effect of 6-mercaptopurine on inflammation.
Amer. J. Path. 40. 519 1962

25. Craddock C.G. Lawrence J.S. The effect of Röntgen irradiation on antibody formation in rabbits.
J. Immunol 60. 241 1948

26. Davidson J.D. Freeman B.B. The effects of antitumor drugs upon P^{32} incorporation into nucleic acids of mouse tumors.
Cancer Res. 15. 31 1955

27. Dixon F.J. Talmage D.W. Bukantz S.C. Radiosensitive and radioresistant phases in antibody production.
Federation Proc. 10. 497 1951

28. Dixon F.J. The metabolism of antigen and antibody.
J. of Allergy 25. 487 1954

29. Elion G.B. Hitchings G.H. Vanderwerff H. Antagonists of nucleic acid derivates. VI. Purines.
J. Biol. Chem. Soc. 192. 505 1951

30. Elion G.B. Burgi E. Hitchings G.H. Studies on condensed pyrimidine synthesis.
IX. The synthesis of some 6-substituted purines.
J. Am. Chem. Soc. 74. 411 1952

31. Elion G.B. Singer S. Hitchings G.H. The purine metabolism of 6-mercaptopurine-resistant Lactobacillus casei.
J. Biol. Chem. 204. 35 1953

32. Dixon F. J. Talmage D.W. Maurer P.H. Radiosensitive and ra-

dioresistant phases in the antibody response.
J. Immunol. 68.693 1952

33. Fagraeus A. Antibody firmation in relation to the development of plasma cells.
Acta. Med. Scandinav. Suppl. 204.1 1948

34. Fischl E.E. Lemay M. Kabat E.A. The effect of the adrenocorticotrophic hormone and X-ray on the amount of circulating antibody.
J. Immunol 61.89 1949

35. Fischl E.E. Stoerk H.C. Bjørneboe M. Failure of cortisone to affect rate of disappearance of antibody protein.
Proc. Soc. Exper. Med. 77.111 1951

36. Friedkin M. The encymic synthesis of 6-mercaptopurine desoxyriboside.
Biochim. Biophys. Acta. 18.447 1955

37. Genghof D.S. Battisto J.R. Antibody production in guinea pigs receiving 6-mercaptopurine.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 107.933 1961

38. Gerhard J.C. Pardee A.B. The encymology of feedback inhibition.
J. Biol. Chem. 237.891 1961

39. Gössner W. Schneider G. Siess M. Stegemann H. Morphologisches und humorales Stoffwechselgeschehen in Leber, Milz und Blut im Verlauf der experimentellen Amyloidose.
Virchows Arch. path. Anat. 320.326 1951

40. Goh K.O. Miller D.G. Diamond H.D. An investigation into the use of 6-mercaptopurine to induce immunological tolerance.
J. Immunol. 86.606 1961

41. Grayzel H.G. Heimer D.M. Saremsky J. Amyloidosis - experimental studies. IX. The effect of corticotropin and cortisone injections upon the production of amyloidosis in albino mice.
Exper. Med. a Surg. 14.332 1956

42. Gueft B. Ghidoni J.J. The site of formation and ultrastructure of amyloid.
Amer. J. Path. 43.837 1963

43. Hampton A. Studies on the action of adenylosuccinase with 6-thio analoges of adenylo succinic acid.
J. Biol. Chem. 237.529 1962

44. Hektoen L. The influence of the X-ray on the production of antibodies.
J. Infect. Dis. 17.415 1915

45. Hektoen L. Further studies on the effect of X-ray on the production of antibodies.
J. Infect. Dis. 20.415 1918

46. Hoyer R.J. Hoyer L.W. Good R.A. Condie R.M. The effect of 6-mercaptopurine on delayed hypersensitivity in guinea pigs.
J. Exper. Med. 116.679 1962

47. Hubay C.A. Powell A. Holden W.D. 6-mercaptopurine and the homograft reaction.
Surg. Forum. 11.468 1960

48. Janssen R.J. Marshall R.G. Gerone P.J. Cheville N.F. The effect of 6-mercaptopurine on variola infections in Rhesus monkeys.
I. The influence of the drug on the resistance and immunological response of the infected host.
II. Hematological studies.

J. Infect. Dis. 111/2.155 1962

49. Katchmann E.F. Effect of 6-mercaptopurine on carbohydrate metabolism of human cancer cells.
Nature 195.4840 1962

50. Kohn H.I. Effect of X-rays upon hemolysin production in the rat.
J. Immunol. 66.525 1951

51. LaPlante E.S. Condie R.M. Good R.A. Prevention of secondary immune response with 6-mercaptopurine.
J. Lab. Clin. Med. 59.542 1962

52. Latvalahti J. The effect of ACTH and cortisone on experimental amyloid degeneration.
Acta Path. Microbiol. Scandinav. (Suppl.) 93.81 1952

53. Latvalahti J. Experimental studies on the influence of certain hormones on the development of amyloidosis.
Acta. Endocrinol. (Suppl. 16) 14.3 1953

54. Lesher S. Grahn D. Sallense A. Amyloidosis in mice exposed to daily Gamma-irradiation.
J. Nat. Cancer Inst. 19.119 1957

55. Letterer E. Ein Beitrag zur experimentellen Amyloidforschung.
Verh. Dtsch. Ges. Path. 20. Tagg. 1925

56. Letterer E. Studien über die Entstehung des Amyloids.
Beiträge zur path. Anat. 75.486 1926

57. Letterer E. Neuere Untersuchungen über die Entstehung des Amyloids.
Virchows Arch. Path. Anat. 293.34 1934

58. Letterer E. Untersuchungen über den Einfluß verschiedenartiger Ernährung auf die experimentelle, Amyloidose. (Zugleich Beitrag zur Frage Antikörperbildung in Abhängigkeit von Ernährung).
Virchows Arch. Path. Anat. 317.1 1949

59. Letterer E. Die Amyloidose im Lichte neuer Forschungmethoden.
Dtsch. med. Wschr. 75.15 1950

60. Letterer E. Vierte Franz Volhard-Gedächtnis-Vorlesung: Über die geweblichen und humoralen Störungen des Eiweißstoffwechsels.
Friedrich-Karl Schattauer Stuttgart 1958

61. Letterer E. Allgemeine Pathologie - Grundlagen und Probleme.
Georg Thieme Stuttgart 1959

62. Lew L.W. Resistance in leucemic cells to an adenine antagonist, 6-mercaptopurine.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 84.409 1953

63. Makinondan T. Gengozian N. Primary antibody response to a distantly related heterologous antigen during maximum depression period after varying doses of X-radiation.
J. Immunol. 81.150 1958

64. Makinondan T. Gengozian N. Primary antibody response to a closely related heterologous antigen after varying doses of X-radiation, and its significance to related biologic phenomena.
J. Immunol. 81.513 1958

65. Malmgren R.A. Bennison B.E. McKinley T.W. The effect of guanzalo on antibody formation.
J. Nat. Cancer Inst. 12.807 1952

66. Mannick J.A. Lee H.M. Egdahl R.H. The effect of 6-mercaptopurine on immune responsiveness of the dog.
Surg. Gyn. Obst. 114.449 1962

67. Miner R.W. Rhoads C.P. 6-mercaptopurine.

Ann. NY Acad. Sci. 60.183 1954

68. Nachtigal D. Feldmann M. Immunological unresponsiveness to protein antigens in rabbits exposed to X-radiation or 6-mercaptopurine treatment.
Immunology 6.356 1963

69. Page R.A. Condie R.M. Good R.A. Effect of 6-mercaptopurine on inflammation.
Amer. J. Path. 40.519 1962

70. Randerath E. Zur pathologischen Anatomie der sogenannten Amyloidnephrose. Zugleich ein Beitrag zur Frage der allgemeinen Amyloidose als Paraproteinose.
Virchows Arch. Path. Anat. 314.388 1947

71. Richter G.W. The resorption of amyloid under experimental conditions
Amer. J. Path. 30.239 1954

72. Robinson J.L. Christian C.L. 6-mercaptopurine in immunological responsiveness.
Nature 187.796 1960

73. Salser J.S. Hutchinson D.S. Balis M.E. Studies on the mechanism of action of 6-mercaptopurine in cell-free preparations.
J. Biol. Chem. 235.429 1960

74. Salvin S.B. Smith R.F. Delayed hypersensitivity in the development of circulating antibodies. The effect of X-irradiation.
J. Exp. Med. 109.325 1959

75. Salvin S.B. Smith R.F. The specivity of allergic reactions.
I. Delayed versus Arthus hypersensitivity.
J. Exp. Med. 111.465 1960

76. Schneider G. Bluteiweiß- und Organeiweißbestand unter Cortisonbehandlung im Experiment.
Verh. Dtsch. Ges. Path. 36. Tagg. 178 1952

77. Schneider G. Über die Pathogenese der Amyloidose. Immunologische, histochemische, und morphologische Untersuchungen
Ergeb. Allgem. Path. und path. Anat. 44.1 1964

78. Schwartz R. Stack J. Dameshek W. Effect of 6-mercaptopurine on antibody production.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 99.164 1955

79. Schwartz R. Eisner A. Effect of 6-mercaptopurine on immune response.
Clin. Res. 7.39 1959

80. Schwartz R. Dameshek W. Drug induced immunological tolerance.
Nature 183.1682 1959

81. Schwartz R. Eisner A. Dameshek W. The effect of 6-mercaptopurine on primary and secondary immune response.
J. Clin. Invest. 38.1394 1959

82. Schwartz R. Dameshek W. The effect of 6-mercaptopurine on homograft reactions.
J. Clin. Invest. 39.952 1960

83. Schwartz R. Dameshek W. The role of drug induced immunologic tolerance.
J. Immunol. 90.703 1963

84. Silbermann H.H. Bennett L.L. Jr. Biochemistry of cancer.
Ann. Rev. Biochem. 27.137 1958

85. Silbermann H.H. Wyngaarden J.B. 6-mercaptopurine as substrate and inhibitor of xanthine oxydase.
Biochim. Biophys. Acta. 47.178

86. Simonds P.J. Jones H.M. The influence of exposure to X-rays

upon the formation of antibodies.
J. Med. Research. 33.183 1915

87. Skipper H.E. On the mechanism of action of 6-mercaptopurine.
Ann. NY Acad. Sci. 60.315 1955

88. Spiegelberg H.L. Miescher P.A. The effect of 6-mercaptopurine and aminopterin on experimental immune thyroiditis in guinea pigs.
J. Exp. Med. 118.232 1963

89. Stender H.St. Strauch D. Winter H. Die Antikörperbildung im Lymphknoten und ihre Beeinflussung durch vorausgegangene Röntgenbestrahlung.
Z. exper. Med. 130.113 1958

90. Sterzl J. Inhibition of the inductive phase of antibody formation by 6-mercaptopurine examined by the transfer of isolated cells.
Nature 185.256 1960

91. van Stipriaan H. Der Einfluß von 6-Mercaptopurin auf die experimentelle Amyloiderzeugung durch Nierenligaturen.
Inaugural-Dissertation Tübingen 1965

92. Taliaferro W.H. Taliaferro L.G. Effect of X-rays on immunity: A review.
J. Immunol. 66.181 1951

93. Taliaferro W.H. Taliaferro L.G. Janssen E.F. The localization of X-ray to the initial phases of antibody response.
J. Inf. Dis. 91.105 1952

94. Taliaferro W.H. Modification of the immune response by radiation and cortisone.
Ann. NY Acad. Sci. 69.745 1957/58

95. Teilum G. Cortisone ascorbic acid interaction and the pathogenesis of amyloidosis. Mechanism of action of cortisone on mesenchymal tissue.
Ann. Rheum. 11.119 1952

96. Teilum G. Studies of pathogenesis of amyloidosis. II. Effect of nitrogen mustard in inducing amyloidosis.
J. Lab. Clin. Med. 43.367 1954

97. Teilum G. Periodic acid-Schiff-positive reticuloendothelial cells producing glycoprotein; functional significance during formation of amyloid.
Am. J. Path. 32.945 1956

98. Turunen M. Teir H. Ganzkörper-Röntgenbestrahlung und Amyloid
Virchows Arch. Path Anat. 334.251

99. Uhr J.W. Scharff M. The effect of X-radiation upon delayed hypersensitivity and antibody formation in guinea-pigs.
J. Clin. Inv. 38.1049 1959

100. Vogt A. Kochem H.G. Histoserologische Untersuchungen mit fluoresceinmarkiertem Antikomplement. Nachweis komplementbindender Substanzen im Amyloid.
Z. Zellforsch. 52.640 1960

101. Wilmanns W. Zum Wirkungsmechanismus von 6-Mercaptopurin.
Klin. Wschr. 40.1170 1962

102. Yates R.A. Pardee A.B. Control of pyrimidine biosynthesis in Escherichia coli by a feedback mechanism.
J. Biol. Chem. 221.757 1956

103. Zukoski C.F. Lee H.M. Hume D.M. The prolongation of functional survival of canine renal homografts by 6-mercaptop.
Surg. Forum 11.470 1960.

Lebenslauf

Am 18. Juni 1937 wurde ich als erstes Kind des kaufmännischen Angestellten Karl Käfer und seiner Ehefrau Klara, geb. Henkel, in Stuttgart geboren. Meine Kindheit und Schulzeit verlebte ich in Eßlingen. Im Herbst 1944 wurde ich eingeschult, und am 4. März 1958 bestand ich am Georgii-Gymnasium in Eßlingen die Reifeprüfung. Die fünf vorklinischen Semester verbrachte ich in Tübingen. Nach dem Physikum studierte ich zwei Semester in Hamburg und in Innsbruck. Seit dem Wintersemester 1962/63 bin ich wieder in Tübingen. In diesem Semester begann ich meine Doktorarbeit, deren experimentellen Teil ich noch vor dem Staatsexamen, das ich am 14. Juli 1964 bestanden habe, beenden konnte. In der Zwischenzeit war ich an der Chirurgischen Universitätsklinik und an der Universitäts-Frauenklinik in Tübingen als Medizinalassistent beschäftigt.

Tübingen, den 30. April 1965